Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. Peiffer

Zur Korrelation der Arylsulfatase-A-Aktivität bei Mutter und Kind

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Immanuel Gußmann
aus Kayh

1980

Aus dem Institut für Hirnforschung
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. Peiffer

Zur Korrelation der Arylsulfatase-A-Aktivität bei Mutter und Kind

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Immanuel Gußmann
aus Kayh

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. K. Harzer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. J. Peiffer

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Zur Korrelation der Arylsulfatase-A-Aktivität bei Mutter und Kind	1
II.	Material und Methodik	4
1.	Probanden	4
2.	Gewinnung der Leukozytenfraktion aus Blutproben	4
3.	Enzymatische Ansätze	5
3.1.	Arylsulfatase A (ASA)	5
3.2.	Vergleichsenzyme	6
3.2.1.	Total-ß-Hexosaminidase (N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase)	6
3.2.2.	Saure-ß-Galaktosidase	6
3.2.3.	ß-Glucuronidase	6
4.	Berechnung der Vergleichsgröße V_r aus den für die drei Vergleichsenzyme erhaltenen Extinktionswerten	7
III.	Ergebnisse und Diskussion	8
IV.	Zusammenfassung	21
V.	Danksagungen	24
VI.	Literaturverzeichnis	25
Tabelle 1		27
Tabelle 2		30
Abbildung 1		32
Abbildung 2		33
Abbildung 3		34

Verzeichnis der benützten Abkürzungen

ASA	=	Arylsulfatase A
MLD	=	metachromatische Leukodystrophie
AE	=	Absorptionseinheiten (Enzymaktivität)
MKP	=	Mutter-Kind-Paar(e)
IPD	=	Intrapaar-Differenz(en)

I. Zur Korrelation der Arylsulfatase-A-Aktivität bei Mutter und Kind

Die Arylsulfatase A (ASA) kontrolliert den Stoffwechselschritt, bei dem ein bestimmtes Lipid aus den Markscheiden des Gehirns, nämlich Sulfatid (Cerebrosidsulfat), in Galaktocerebrosid und Sulfat zerlegt wird. Ist diese Zerlegung durch Ausfall der ASA-Aktivität im Stoffwechsel blockiert, so häuft sich Sulfatid in den Markscheiden an, worauf diese zu Grunde gehen. Es entwickelt sich das Krankheitsbild der metachromatischen Leukodystrophie (MLD; Dulaney and Moser, 1978). Die Patienten sind homozygot für ein Defektallel (oder "stummes" Allel) der ASA, welches als ASA^{o} bezeichnet werden kann. Die MLD ist zwar selten (Frequenz ca. 1 : 40 000, vgl. Eibl, 1977; Dulaney and Moser, 1978), differentialdiagnostisch muß sie jedoch bei Patienten mit neurodegenerativer Symptomatik ausgeschlossen werden. Der Ausschluß ist nur mit biochemischen Methoden, also z. B. mit der ASA-Bestimmung aus Blut, Urin etc. sicher möglich. Eine Therapie der MLD ist bisher nicht möglich. Die pränatale Diagnose der Homozygotie für ASA^{o} hat in den Familien große Bedeutung, in denen nach der Anamnese (kranke Geschwister oder Sippenangehörige) mit Homozygoten gerechnet werden kann.

Heterozygote ASA^{o}/ASA^{+} - also z. B. die Eltern der Patienten mit MLD - haben nur ein intaktes Allel. Besteht eine fixe Beziehung zwischen Gendosis und Aktivität, so sollten die Eltern eine Enzymaktivität aufweisen, die signifikant unter dem Wert der homozygot Gesunden liegt. In der Bevölkerung sollte also eine multimodale Verteilung von Aktivitätsklassen (z. B. 0 % = krank, 50 % = heterozygot für ASA^{o}, 100 % Aktivität = homozygot für ASA^{+}) erkennbar sein.

In der Praxis fanden Kihara et al. (1973) in den Leukozyten des Bluts folgende relative ASA-Aktivitäten: 4 Patienten mit MLD, 0 - 10 %; 7 Eltern der Patienten (Heterozygote), 30 - 101 %; 65 Probanden (die auch Heterozygote enthalten können), 28 - 240 %. Wegen der Überlappung der Bereiche ist es unmöglich, heterozygot und homozygot gesunde Probanden fehlerfrei zu trennen. Diese Streuung ist natürlich zu einem bestimmten Teil methodisch bedingt, zum anderen aber sicher auch genetisch verursacht.

Im Schnitt sind für jeden Genort 3 - 4 Allele (multiple Allelie) in der Bevölkerung anzunehmen. Soweit diese Allele auch die Aktivität der Genprodukte variieren (vgl. Kömpf et al.; 1974), sind sie der Grund für einen Aktivitätspolymorphismus, dessen Analyse besondere Anforderungen an die Meßmethoden stellt. Die Streuung der gemessenen Enzymaktivitäten muß so klein gehalten werden, daß die Aktivitätsklassen der verschiedenen möglichen Phänotypen ohne Überlappung als distinkte Klassen erkennbar werden.

Einen Analyseweg könnte die Bearbeitung von Mutter-Kind-Paaren eröffnen, denn Mütter und Kinder haben ja ein Allel gemeinsam. Nehmen wir z. B. unter Einschluß des MLD-Allels zwei Allele an: ASA° für die Aktivität 0 % und ASA^{+} für die Aktivität 50 %, so existieren drei Phänotypen: Aktivität 0 beim Genotyp ASA°/ASA°, Aktivität 50 % bei ASA°/ASA^{+} und Aktivität 100 % bei ASA^{+}/ASA^{+}. Damit verteilen sich die kindlichen Phänotypen auf die mütterlichen entsprechend folgender Matrize:

Kind \ Mutter		Aktivität 0	50	100
Aktivität	0	ja	ja	nein
	50	ja	ja	ja
	100	nein	ja	ja

Mit unserer Arbeit war zu prüfen, ob eine entsprechende Abhängigkeit für ein System von 2 oder 3 Allelen, die hinter dem "Normalallel" ASA^+ verborgen sein könnten, erkennbar wird.

II. Material und Methodik

1. Probanden

Die Stichprobe umfaßte 64 Mutter-Kind-Paare (128 Probanden). Davon stammten 38 Paare aus dem Raum Tübingen-Herrenberg, die sich freiwillig zur Blutentnahme bereit erklärten; die Blutproben von 26 Paaren wurden durch das Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen vermittelt. Die Altersverteilung lag bei den Kindern zwischen 4 und 32 Jahren, bei den Müttern zwischen 25 und 63. Bei keinem der Probanden ergaben sich Hinweise auf eine neurologische Erkrankung in der Familie, z. B. im Sinne der MLD.

2. Gewinnung der Leukozytenfraktion aus Blutproben

Je 5 ml Venenblut wurden mit 1 ml wässriger Dextran (5 %)-Kochsalz (0,7 %)-Heparin (0,05 %)-Lösung gemischt. Nach 1-stündiger Sedimentation bei 20 ^{o}C, die durch die Dextran-Heparin-Lösung beschleunigt abläuft, wurde der Leukozyten-Plasma-Überstand abpipettiert, und die Erythrozyten-Säule verworfen. Durch Zentrifugieren (10 min, 600 g) wurden die Leukozyten vom Plasma-Überstand getrennt. Das zurückbleibende Leukozyten-Sediment wurde mit 5 ml physiologischer Kochsalz-Lösung aufgeschwemmt, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen. Einfrieren der Leukozyten-Sedimente bei - 30 ^{o}C (maximal 4 Monate) bis zur weiteren Bearbeitung: Auftauen durch Zugabe von 1 ml Aqua bidest., anschließende Ultraschallbehandlung (1 min.) zur kompletten Lyse der Leukozyten. Die Lysate wurden für die Enzymbestimmungen verwendet. - In Kontrollproben wurden Enzymbestimmungen vor dem Einfrieren sowie nach 1-, 2- und 4-monatigem Einfrieren

von Teilen der Proben durchgeführt. Die Enzymaktivitäten blieben über diesen Zeitraum im Rahmen der methodischen Fehlerbreite (10 - 15 %) unverändert.

3. Enzymatische Ansätze

Je 50 µl der Leukozytenlysate (im folgenden als Proben bezeichnet) wurden in Vielloch-Platten aus Plastik verteilt. Die Aliquote dienten zum Ansatz der Aktivitäten der Arylsulfatase A, Total-ß-Hexosaminidase, sauren ß-Galaktosidase und ß-Glucuronidase (alles lysosomale Enzyme mit saurem pH-Optimum) in Doppelbestimmung und für entsprechende Leerwerte. Für den Umgang mit den chromogenen Substraten und den enzymatisch freigesetzten, gefärbten Produkten nach der Inkubationsphase hat sich die Arbeit auf Schuppeneis und im abgedunkelten Raum bewährt.

3.1. Arylsulfatase A (ASA)

50 µl Probe wurden mit 150 µl Substrat-Lösung gemischt. Diese bestand aus 10 mM 2-Hydroxy-5-Nitrophenyl-Sulfat (p-Nitrocatechol-Sulfat) als eigentlichem Substrat, 5×10^{-4} M Natriumpyrophosphat als Inhibitor der Arylsulfatase B sowie 10 % NaCl als Reaktionsstabilisator in 0,5 M Na-Acetat Puffer pH 5,0 (Baum et al., 1959). Die Reaktion wurde für die Leerwerte sofort, für die Reaktionsansätze nach 3 Std. Inkubation bei 37 ^{o}C, durch Zugabe von 0,4 ml alkalischem Puffer pH 10,3 gestoppt. (Puffer aus 1 Teil 1 N Natronlauge und 4 Teilen 1,5 M 2-Amino-2-methyl-1-propanol). Von Leerwert- und Reaktionsansätzen wurde die Extinktion bei 515 nm gemessen. Als Maß für die Enzymaktivität galt die Extinktion nach Abzug des Leerwerts. Eine Extinktionsdifferenz von 0,01 wurde in dieser Studie als Absorptionseinheit (AE) bezeichnet.

3.2. Vergleichsenzyme

3.2.1. Total-ß-Hexosaminidase (N-Acetyl-ß-D-Glucosaminidase)

50 µl Probe wurden mit 150 µl Wasser verdünnt und in 2 Teile zu 100 µl geteilt (gleiches Vorgehen beim Leerwert). Die Verdünnung ist wegen der zu erwartenden hohen Extinktion sinnvoll. Danach pro 100 µl verdünnte Probe Zugabe von 0,5 ml Substrat-Lösung (2 mM p-Nitrophenyl-ß-D-N-Acetyl-Glucosaminid in 0,1 M Natriumcitrat-Puffer pH 4,5). Nach 60 min. Inkubation (Leerwert 0 min.) Stoppen der Reaktion mit 0,4 ml alkalischem Puffer (s. 3.1. Messung der Extinktion bei 405 nm.

3.2.2. Saure ß-Galaktosidase

Ausführung wie 3.1.; 50 µl Probe wurden mit 150 µl Substrat-Lösung (2 mM p-Nitrophenyl-ß-D-Galaktopyranosid und 86 mM Kochsalz in 0,5 M Acetatpuffer pH 5,0) vermischt. Inkubationsdauer 90 min., Extinktionsmessung bei 405 nm nach Alkalisierung mit 0,4 ml Puffer (s. 3.1.), Bildung der Differenz gegen den Leerwert.

3.2.3. ß-Glucuronidase

Ausführung wie 3.1. bzw. 3.2.2., jedoch mit der Substrat-Lösung von 2 mM p-Nitrophenyl-ß-D-Glucuronid in 0,1 M Natrium-Citrat-Puffer pH 4,2; Inkubationsdauer, Alkalisieren und Extinktionsmessung wie bei 3.2.2.

4. Berechnung der Vergleichsgröße V_r aus den für die drei Vergleichsenzyme erhaltenen Extinktionswerten

Der V_r-Wert wurde aus den relativen Aktivitäten der drei Vergleichsenzyme Total-ß-Hexosaminidase, saure ß-Galaktosidase und ß-Glucuronidase berechnet. Relative Aktivität bezeichnet die für das Vergleichsenzym A, B oder C jedes Probanden i (i = 1,2,3...n) als Extinktion gemessene Aktivität bezogen auf das arithmetische Mittel der Extinktionen dieses Einzelenzyms bei allen Probanden. Die relativen Aktivitäten der Einzelenzyme seien A_R, B_R, C_R. Der Wert V_r errechnete sich dann für jeden Probanden i:

$$V_{r,i} = 17 \; (\; A_{R,i} \; + \; B_{R,i} \; + \; C_{R,i} \;)$$

Der Faktor 51 : 3 = 17 diente dazu, bei drei Vergleichsenzymen alle V_r in den Bereich um 51 zu legen (das ist der Mittelwert der ASA-Aktivitäten, s. Tabelle 1), wodurch ASA-Aktivitäten und V_r-Werte leichter verglichen werden konnten.

III. Ergebnisse und Diskussion

Bei der Bestimmung der ASA-Aktivität aus Blutleukozyten hat es sich gezeigt, daß die große Variation (um Faktoren 7 - 9) relativ unabhängig davon ist, ob die gemessenen Werte in Bezug auf gleiche Mengen eingesetzten Leukozyten-Proteins (Kihara et al., 1973), gleiche Leukozytenzahl (vorläufige Beobachtung) oder gleiches Volumen an verarbeitetem Blut angegeben werden. Da die letztgenannte Normierung die einfachste und somit am wenigsten störungsanfällige ist, fand sie für diese Studie Verwendung.

Die ASA-Aktivitäten von den 64 untersuchten Mutter-Kind-Paaren (MKP) sind in Tabelle 1 und Abbildung 1 wiedergegeben. Der Verdacht lag nahe, daß die große Variabilität der Werte sich aus einer methodischen bzw. umweltbedingten Streuung (kurz: methodischer Fehler) und einer genetischen Variation zusammensetzt. Da uns die genetische Variation interessierte, versuchten wir abzuschätzen, in welchem Grad sie von dem methodischen Fehler überdeckt war. Dafür bot sich die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten r der ASA-Aktivität von Mutter und Kind an. Dieser beträgt für frei vererbliche quantitative Merkmale und so auch für Enzymaktivitäten theoretisch $r = 0{,}5$ (vgl. Lenz und Lenz, 1968). Je näher der aus den experimentellen Daten ermittelte Korrelationskoeffizient diesem Wert kommt, desto mehr dürfte die rein genetische Variation der Daten zum Vorschein kommen.

Aus den ASA-Aktivitäten der Tabelle 1 errechnete sich ein Mutter-Kind-Korrelationskoeffizient von nur $r = 0{,}225$, so daß der Versuch, etwas über die genetische Variation der Werte auszusagen, keinen Erfolg versprach. Nach Eliminierung dreier Paare (Nr. 38, 47 und 49) mit extremen ASA-Werten stieg die Korrelation auf $r = 0{,}359$

an und war damit hochsignifikant von Null verschieden. Dieser Korrelationskoeffizient war seinerseits nicht signifikant von dem theoretischen Wert 0,5 verschieden (95 %-Vertrauensbereich 0,118 - 0,560 für r). Die Paare 38, 47 und 49 waren zwar aufgrund extremer ASA-Werte eliminiert worden, jedoch war ihre geringe Vergleichbarkeit mit der übrigen Stichprobe auch auf andere Art und Weise festzustellen: Die für jede Einzelprobe mitbestimmte Vergleichsgröße V_r (s. Methodik) hatte bei den drei Paaren ebenfalls extreme Werte. Unten wird gezeigt, daß die Größe V_r recht gut geeignet ist, die mit der übrigen Stichprobe wenig vergleichbaren Proben zu erkennen.

Für die bereinigte Stichprobe von 61 MKP war nach dem Korrelationskoeffizienten r = 0,359 nun anzunehmen, daß die Variation ihrer Aktivitäten zumindest vorwiegend genetisch bedingt sei. Bei dem Versuch, die genetische Variation der ASA-Aktivität zu analysieren, gingen wir von der Hypothese aus, diese Aktivität würde durch differente Allele gesteuert, von denen jedes einen bestimmten, abgrenzbaren Aktivitätsbetrag hervorruft, so daß auch die verschiedenen Allel-Kombinationen (Genotypen) zu distinkten Aktivitätsklassen führen (Aktivitätspolymorphismus bei multipler Allelie, s. Einleitung). Wir untersuchten daher die Häufigkeitsverteilung der ASA-Aktivitäten der 2 x 61 Probanden der bereinigten Stichprobe, zunächst ohne Rücksicht auf die genetische Beziehung innerhalb der MKP. Wir fanden keinen eindeutigen Hinweis auf distinkte Aktivitätsklassen (vgl. auch Darstellung in Abb. 1, die keine Gruppierungen erkennen läßt). Sodann bildeten wir die Mutter-Kind-Differenzen der Aktivitäten (Intrapaar-Differenzen, im folgenden als IPD abgekürzt) und stellten fest, daß auch sie in ihrer Häufigkeitsverteilung keine distinkten Klassen

zeigten (die ja die Hypothese ebenfalls fordern würde). Nur das gehäufte Auftreten niedriger IPD war im Vergleich zu den mitberechneten Interpaar-Differenzen (Differenzen der Summen der Aktivitäten von Mutter un Kind) als Ausdruck der Mutter-Kind-Verwandtschaft eindeutig nachweisbar. Nach dem Maximum-Test (Walter, 1958, zitiert bei Sachs, 1968) hatten die 19 größten Unterschiede zwischen IPD und Interpaar-Differenzen dieselbe Richtung (zu kleinen IPD hin). Damit ist die Tendenz der IPD zu kleineren Werten hin signifikant ($< 0{,}1$ %-Niveau).

Nach wie vor schien aber die zufällige Streuung der Meßwerte (methodischer Fehler) noch immer die genetischen Variationen der ASA, z. B. in Gestalt eines Aktivitätspolymorphismus, zu überdecken. Wir entschlossen uns daher zu einer weiteren Aussiebung möglicherweise fehlerhafter Proben aus der Gesamtstichprobe. Die Auswahl sollte aber nicht von den ASA-Werten selbst ausgehen, weil sonst die Gefahr bestand, Werte auszusondern, die tatsächlich aus genetischen Gründen vom Durchschnittswert abwichen, also gerade für die Frage des Aktivitätspolymorphismus wichtig sein würden. Vielmehr wurde für die Ausscheidung weiterer MKP wiederum der V_r-Wert (s. oben und S. 18) herangezogen unter der Vorstellung, die technische Vergleichbarkeit der MKP sei umso besser, je enger der Bereich ist, in dem sich die V_r-Werte von Mutter und Kind bewegen. Es wurden alle MKP ausgeschieden, bei denen auch nur ein Paarling einen V_r-Wert besaß, der außerhalb der einfachen Standardabweichung aller V_r-Werte lag (Tab. 1). Auf diese Weise eliminierten wir weitere 20 Paare. Unsere Hoffnung fand sich bestätigt, daß trotz der beträchtlichen Stichproben-Beschneidung die ASA-Werte der verbliebenen, doppelt bereinigten Stichprobe von 41 MKP noch genügend variierten, um Raum für Aktivitätsunterschiede (z. B.

Faktoren 2 - 4) der Phänotypen eines Aktivitätspolymorphismus zu geben. Die ASA-Aktivität variierte um den Faktor 3,7, der V_r-Wert nurmehr um den Faktor 1,5. Dieses Ergebnis stand nicht im Widerspruch zu der starken Korrelation des V_r-Werts mit der ASA-Aktivität (r ca. 0,6, s. unten S. 18).

Die Häufigkeitsprofile der Aktivitätswerte der doppelt bereinigten Stichprobe (41 MKP, Abb. 2) ließen nun Andeutungen einer nicht mehr monomodalen Verteilung erkennen. Die ASA-Aktivitätswerte zeigten Häufigkeitsakzentuierungen in der Gegend um 45 und 60 Absorptionseinheiten (AE; in den Tabellen und Abbildungen benütztes Aktivitätsmaß). Wegen der starken Überlappung zu Nachbarklassen konnte allerdings nicht von distinkten Aktivitätsklassen gesprochen werden. Die IPD der 41 Paare verteilten sich indessen in der Weise, daß eine (Doppel-) Klasse der Differenzen zwischen 11 und 17 AE nahezu distinkt hervortrat (Abb. 3), neben einer Häufung von IPD unterhalb 8 AE. Abbildung 3 wurde versuchsweise folgendermaßen interpretiert: Die IPD zwischen 0 und 8 AE entsprechen der theoretischen Differenz von 0 (gleicher Phäno- und Genotyp bei Mutter und Kind) und variieren nur infolge der immer noch beträchtlichen zufälligen Streuung (methodischer Fehler). Die zwischen 11 und 17 AE gehäuften IPD mit ihrem errechneten Mittelwert 15 AE entsprechen jedoch eher der Differenz verschiedener Phänotypen, deren Genotypen sich in einem Allel unterscheiden. Die IPD von 15 AE gibt also den Unterschied definierter Aktivitätsbeträge an, die von zwei Allelen ASA^1 und ASA^2 hervorgerufen werden.

Die zuvor genannten Häufigkeitsakzentuierungen der ASA-Aktivitätswerte in der Gegend um 45 und 60 AE unterscheiden sich gerade um 15 AE. Ging man von der einfachen Hypothese eines multipel-allelen Systems mit zwei Allelen aus, von denen z. B. das eine einen bestimmten Aktivitätsbetrag, das andere den doppelten Betrag hervorruft, die aber beide mit ähnlicher Frequenz auftreten, so war nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz die heterozygote Kombination der beiden Allele als häufigster Genotyp zu erwarten. Von den genannten Aktivitätsstufen 45 und 60 AE, die wir als präsumptive Phänotypen bezeichnen wollen, erschien die Stufe 45 AE etwas häufiger besetzt (Abb. 2). Dieser Phänotyp konnte also seinen Grund in einem heterozygoten Genotyp ASA^1/ASA^2 haben, dessen Allele ASA^1 den Aktivitätsbetrag 15 AE und ASA^2 30 AE hervorrufen. Der präsumptive Phänotyp 60 AE war nun zwanglos dem Genotyp ASA^2/ASA^2 zuzuordnen. Es blieb noch der Phänotyp 30 AE für den Genotyp ASA^1/ASA^1 zu fordern. In der Stichprobe von 41 MKP befanden sich einige entsprechende ASA-Werte. Wegen des gemeinsamen Allels innerhalb der MKP waren bei den angenommenen Genotypen ASA^1/ASA^1, ASA^1/ASA^2 und ASA^2/ASA^2, abgesehen von dem methodischen Fehler, aktivitätsphänotypisch nur IPD mit 0 oder 15 AE zu erwarten.

Bevor wir die formalgenetische Hypothese der multiplen Allelie ASA^1 - ASA^2 weiterverfolgen, ist noch kurz auf die sporadischen hohen IPD (größer als 20 AE in Abb. 3) einzugehen. Diese können als zufällig gleichsinnige Addition von großen methodischen Fehlern bei der Aktivitätsbestimmung von Mutter und Kind angesehen werden, könnten aber auch mit einem dritten, zu noch höherer Aktivität führenden ASA-Allel zusammenhängen. Dessen mögliche Existenz soll der Übersichtlichkeit halber hier nicht weiter diskutiert werden.

Zur weiteren Prüfung der Hypothese zweier Allele ASA^1 und ASA^2 ging unser Bestreben dahin, die gemessenen Aktivitätswerte der doppelt bereinigten Stichprobe von 41 MKP einer der bei zwei Allelen (3 Genotypen) möglichen 7 Genotyp-Kombinationen von Mutter und Kind zuzuordnen. Die Kombinationen lauten (präsumptive Phänotyp-Kombinationen in Klammern, Aktivitäten als AE):

ASA^1/ASA^1 - ASA^1/ASA^1 (30 - 30)

ASA^1/ASA^1 - ASA^1/ASA^2 (30 - 45)
ASA^2/ASA^1 - ASA^1/ASA^1 (45 - 30)
ASA^1/ASA^2 - ASA^1/ASA^2 (45 - 45)

ASA^1/ASA^2 - ASA^2/ASA^2 (45 - 60)
ASA^2/ASA^2 - ASA^1/ASA^2 (60 - 45)
ASA^2/ASA^2 - ASA^2/ASA^2 (60 - 60)

In Tabelle 2 ist das (weiter unten kritisierte) Ergebnis unseres Zuordnungsversuchs dargestellt. Die gemessenen ASA-Aktivitäten sind im Gegensatz zu Tabelle 1 (Mittelwerte) als Doppelbestimmungen aufgeführt, um einen Überblick über die Fehlerbreiten zu geben, die bei der Zuordnung zu den präsumptiven Phänotypen zu berücksichtigen waren. Die Variation der Doppelbestimmungen dürfte innerhalb eines jeden MKP den gesamten methodischen Fehler einigermaßen beschreiben, da die Proben der Paarlinge immer zusammen bearbeitet wurden. Der Fehler zwischen den MKP unterlag aber sicher bisweilen wechselnden äußeren Einflüssen, da nicht alle MKP simultan bearbeitet werden konnten. Bei einzelnen MKP (Nr. 4, 6, 26, 52, 61 und 64) variierten die Doppelbestimmungen erheblich (Pipettierfehler?), nämlich um 20 bis 35 %, wobei der höchste Unterschied verständlicherweise bei niedrigen

Aktivitätswerten (Paar 61) auftrat. Nicht nur aufgrund solcher Fehler, die durch Mittelwertbildung der Doppelbestimmungen gemildert wurden, war die Zuordnung einer Reihe von Paaren (Nr. 6, 9, 26, 31, 37, 40, 61 und 64) zu den präsumptiven Phänotyp-Kombinationen problematisch. Die Paare 12, 17, 20, 40, 45 und 51 mit meist hohen Werten konnten überhaupt nicht sinnvoll zugeordnet werden; wir berücksichtigten sie daher nicht weiter, waren uns aber im klaren, daß wir dadurch evtl. eine für die angestrebte Aussage unzulässige Auslese getroffen haben (Möglichkeit eines dritten, somit ausgeschiedenen ASA-Allels?).

Formal verfuhren wir im einzelnen folgendermaßen: Aktivitätswerte unter 37,5 AE wurden dem Phänotyp 30 AE, Werte zwischen 37,5 und 52,5 dem Phänotyp 45 AE und Werte zwischen 52,5 und 67,5 dem Phänotyp 60 AE zugeordnet. Für Werte, die bei den Grenzen 37,5 und 52,5 AE lagen, konnte keine Entscheidung getroffen werden, sie wurden abwechselnd den benachbarten Phänotypen zugeschlagen. Für die Zuordnung einiger Paare mußten schließlich noch zwei weitere Annahmen gemacht werden: 1) Wenn die Werte der Doppelbestimmungen stark differierten, wurde nicht der Mittelwert, sondern nur der Wert berücksichtigt, der näher bei einem präsumptiven Phänotyp lag, in der Annahme, der andere Wert würde zufällig (Pipettierfehler ?) stark von diesem Phänotyp abweichen (Paare Nr. 6, 9, 26, 64). - 2) Wenn die IPD bei einem Paar in der Nähe von 15 AE lag, die Werte beider Paarlinge aber noch innerhalb der oben angesetzten Aktivitätsgrenzen für die Zuordnung zu ein und demselben Phänotyp lagen, wurden dennoch zwei Phänotypen angenommen (Paar 37), also die IPD berücksichtigt, weil innerhalb des Paars ein geringerer Fehler zu vermuten war als zwischen den Paaren (s. oben).

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Zuordnungsversuchs zu den präsumptiven Phänotypen 30, 45 und 60 AE so dargelegt, daß die durch die hypothetischen Allele ASA^1 und ASA^2 hervorgerufenen Aktivitätsbeträge 15 und 30 AE direkt zu erkennen sind. Somit konnten auch die präsumptiven Häufigkeiten der beiden Allele direkt ausgezählt und zu der Gesamtzahl von 4 x 35 Allelen (35 ausgewertete Paare) in Beziehung gesetzt werden. Es ergaben sich die Frequenzen $p = 0{,}357$ für ASA^1 und $q = 0{,}643$ für ASA^2.

Mit diesen Frequenzen berechneten wir nach der theoretischen, aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz abgeleiteten Verteilung der Frequenzen zweier Allele auf MKP die Erwartungshäufigkeiten der 7 möglichen Genotyp-Kombinationen bei Mutter und Kind. Sie sind in der folgenden, üblichen Matrizen-Darstellung bereits in die Anzahl der MKP aus 35 ausgewerteten Paaren umgerechnet und in Klammern aufgeführt. Den Erwartungshäufigkeiten ist die gemäß der obigen Zuordnung gefundene Anzahl von Paaren gegenübergestellt.

Mutter / Kind		Genotyp	ASA^1/ASA^1	ASA^1/ASA^2	ASA^2/ASA^2
		Phänotyp (AE)	15+15	15+30	30+30
Genotyp	Phänotyp(AE)				
ASA^1/ASA^1;	15+15		2 (p^3x35 =1,58)	2 (p^2qx35 =2,87)	
ASA^1/ASA^2;	15+30		2 (p^2qx35 =2,87)	10(pqx35 =8,05)	6 (pq^2x35 =5,18)
ASA^2/ASA^2;	30+30			4 (pq^2x35 =5,18)	9 (q^3x35 =9,31)

Die gefundene Verteilung scheint nur zufällig von der erwarteten abzuweichen. Die Symmetrie in den p^2q- bzw. pq^2-Feldern, sowie überhaupt in den beiden durch ASA^1/ASA^2 bezeichneten Achsen der Heterozygoten ist gut angenähert. Auf eine statistische Behandlung wird verzichtet, denn sie erhöht bei der geringen Anzahl von 35 Paaren und bei dem sicher noch beträchtlichen methodischen Fehler die Sicherheit der angestrebten Aussage nicht.

Wir möchten also das Ergebnis der Matrize äußerst vorsichtig als Argument für die Existenz zweier ASA-Allele bewerten. Die Zuordnung der experimentellen Werte in Tabelle 2 zu präsumtiven Phänotypen 30, 45,und 60 AE beruhte auf einer Reihe zwar plausibler, aber unbewiesener Annahmen, erfolgte also keineswegs zwingend. Es sind sicher mehr Zuordnungsfehler unterlaufen, als es nach der Matrize den Anschein hat. Die Zuordnung dürfte zum Teil in den verschiedenen, möglichen Richtungen verfehlt worden sein, so daß sich die Fehler teilweise kompensiert haben. Die Zahl von 35 ausgewerteten Paaren ist wie gesagt gering. Sechs Paare der doppelt bereinigten Stichprobe von 41 MKP konnten überhaupt nicht zugeordnet und daher nicht berücksichtigt werden (s. oben). Die meist hohe ASA-Aktivität dieser 6 Paare kann zwar methodischen Fehlern zugeschrieben werden (die allerdings gerade bei höheren Aktivitäten geringer sein sollten), läßt aber auch die Möglichkeit eines dritten ASA-Allels - von der wir zunächst nicht ausgegangen waren - offen. Natürlich hätten wir unter der Annahme von drei Allelen anders vorgehen und die Aktivitätswerte anders zuordnen müssen.

Insgesamt meinen wir, erste Anhaltspunkte dafür bekommen zu haben, daß die normale ASA-Aktivität von mehr als einem Allel gesteuert wird. Der hinreichende Beweis dieses

Aktivitätspolymorphismus steht jedoch noch aus.

Das erzielte, vorläufige Ergebnis führte uns dazu, folgende Fragenkomplexe anzuschneiden:

1) Bedeutung des sich abzeichnenden Aktivitätspolymorphismus der ASA für die Identifizierung heterozygoter Überträger der MLD (s. Einleitung) und damit für die zunehmend geforderte, effektivere genetische Beratung der Risikofamilien.

2) Möglichkeiten unabhängiger Verfahren und Verbesserung der bisherigen Methoden für den als wichtig erkannten, weiteren Nachweis dieses Polymorphismus.

Die Identifizierung der Heterozygoten in Gruppen mit einem Risiko für MLD kann aussichtsreicher werden, als es in einer früheren Arbeit dargestellt wurde (Kihara et al., 1973). Schon jetzt ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, daß (mindestens) zwei für das MLD-Allel (ASA^{o}) heterozygote Genotypen ASA^{o}/ASA^{1} und ASA^{o}/ASA^{2} existieren. Weil der zweite aktivitätsphänotypisch dem nicht pathologischen Genotyp ASA^{1}/ASA^{1} entsprechen würde, müßte er von diesem mit geeigneter Methodik und durch gleichzeitige Familien-Untersuchung abgegrenzt werden, was bisher nicht gelingt.

Geeignete Methoden sind nicht nur quantitative, noch präziser zu gestaltende Aktivitätsbestimmungen der ASA (s. unten), sondern können auch in einer qualitativen Differenzierung der Produkte der Allele ASA^{1} und ASA^{2} zu suchen sein. Die Annahme, daß die beiden Genprodukte z. B. verschiedene elektrophoretische oder enzymkinetische Eigenschaften haben, ist nicht fernliegend. Hier müssen

weitere Arbeiten ansetzen und sind von uns geplant. Vordringlich erscheint aber die Verbesserung der quantitativen Aktivitätsbestimmung. Durch Automatisierung der Labortechnik ist sicher gegenüber der von uns ausgeführten Handarbeit mehr Präzision zu erzielen. Aber auch Blutentnahme, Leukozyten-Präparation, Einfriervorgang und -dauer vor der Analyse sowie Herstellung der Leukozyten-Lysate könnten sicher noch mehr standardisiert werden. Diese technischen Vorgänge sind auf dem Weg zum endgültigen Nachweis des Aktivitätspolymorphismus der ASA unbedingt verbesserungswürdig.

Aussicht auf eine zuverlässigere Aktivitätsbestimmung besteht unseres Erachtens auch bei der Suche nach einer von der ASA-Aktivität unabhängigen Vergleichsgröße, die geeignet ist, mit Fehlern behaftete Proben zu erkennen, um diese ausscheiden bzw. wiederholen zu können. Der in dieser Studie benützte V_r-Wert (s. Seite 10) scheint diese Eigenschaft in relativ hohem Maß zu haben. Wir konnten zeigen, daß der V_r-Wert stark mit der ASA-Aktivität korreliert ist ($r = 0{,}565$ für die Mütter und $r = 0{,}619$ für die Kinder; $n = 64$). Die Korrelationswerte entkräften den denkbaren Einwand, der V_r-Wert würde als Aktivitätsparameter ebenso wie die ASA-Aktivität frei variieren, hätte also keinen Bezug zu dieser. Trotzdem wird der V_r-Wert sicher dann unzuverlässig sein, wenn eine besondere Variation einer der drei wie die ASA lysosomal lokalisierten Vergleichsenzymaktivitäten, aus denen er gemittelt ist, einmal "durchschlägt". Der V_r-Wert ist andererseits dadurch charakterisiert, daß er im Gegensatz zu einzelnen Enzymaktivitäten keine Korrelation zwischen Mutter und Kind zeigt ($r = 0{,}091$; $n = 64$) und mit einem Variationskoeffizient von 16 % in unserer Stichprobe deutlich weniger streut als die einzelnen Enzymaktivitäten. Dies sind für Analysen der durchge-

führten Art günstige Eigenschaften einer Vergleichsgröße.

Andere Parameter wie z. B. der Leukozyten-Proteingehalt und die Leukozytenzahl dürften als Vergleichsgrößen für die ASA-Aktivität zwar ähnliche Eigenschaften wie der V_r-Wert haben (einschlägige Literatur fehlt) und sind sicher einfacher als dieser zu bestimmen; nach unseren vorläufigen Erfahrungen lassen sie jedoch eine etwas geringere Korrelation zur ASA-Aktivität erkennen (r beträgt ca. 0,5) und sind störungsanfälliger (wechselnde Hämoglobin-Beimengungen verfälschen den Proteingehalt; gleiche Leukozytenzahl kann aufgrund variierender Mischungsverhältnisse der einzelnen Leukozytentypen mit ihrem unterschiedlichen Enzymbesatz schwankende ASA-Aktivität ergeben).

Ein anderer Weg zur besseren Standardisierung der ASA-Bestimmung könnte der sein, anstatt der Gesamt-Leukozytenpopulation nur die Lymphozyten aus den Blutproben zu isolieren; entsprechende Methoden sind verfügbar. Die Lymphozytenfraktion dürfte eine wesentlich konstantere Zusammensetzung als die Gesamt-Leukozytenpopulation haben und enthält nach der Literatur (Beratis et al., 1975) immerhin 30 - 50 % der ASA aller Leukozyten. In der Lymphozytenfraktion würden Zellzahl und Proteingehalt wahrscheinlich zuverlässigere Vergleichsgrößen für die Aktivität der ASA darstellen, aber auch ein unserem V_r-Wert vergleichbarer Parameter könnte zusätzlich herangezogen werden.

Die dringender werdende Forderung der genetischen Berater nach enzymatischer Heterozygoten-Identifizierung und pränataler Diagnostik in Familien mit genetischen

Stoffwechseldefekten wie MLD und andere nicht therapierbare, fatale Krankheitsbilder rechtfertigen jeden Versuch, die Treffsicherheit der biochemisch-diagnostischen Methoden zu erhöhen. Eine zuverlässige Abgrenzung pathologischer enzymatischer Phänotypen ist aber nur möglich, wenn auch die häufigeren, klinisch nicht relevanten, enzymatischen Phänotypen bekannt sind. Deren Erfassung setzt jedoch oft eine wesentlich höhere methodische Genauigkeit voraus, als sie für die meisten Aussagen in der klinischen Chemie notwendig ist. Viele Enzymbestimmungsmethoden, so auch die für die ASA-Aktivität, sind daher zweifellos verbesserungswürdig.

IV. Zusammenfassung

Bei 64 Mutter-Kind-Paaren wurde in den Lysaten von Blut-Leukozyten die Arylsulfatase A (ASA) bestimmt mit dem Ziel, Anhaltspunkte für eine durch mehrere Allele (ASA^1, ASA^2, ...) stufenweise gesteuerte ASA-Aktivität zu bekommen. Ein solcher Aktivitätspolymorphismus wurde aufgrund der breiten Streuung der ASA-Aktivität (Variationskoeffizient 31 %) vermutet, die keinesfalls nur durch methodische Fehler zu erklären war. Inwieweit aber methodische Fehler in die Streuung eingingen, wurde dadurch abzuschätzen versucht, daß der Korrelationskoeffizient r der Aktivität von Mutter und Kind berechnet und mit dem theoretischen Erwartungswert r = 0,5 verglichen wurde. Nach geringer Bereinigung der Stichprobe (siehe unten) ergab sich ein Wert von r = 0,359, der nicht signifikant von 0,5 verschieden ist.

Trotzdem war der methodische Fehler offenbar noch so groß, daß sich in der Häufigkeitsverteilung der ASA-Aktivität keine distinkten Aktivitätsklassen abzeichneten, wie sie bei einem Aktivitätspolymorphismus zu fordern wären. Dies änderte sich etwas nach einer weiteren drastischen Reduzierung der Stichprobe bis auf 41 Paare.

Die Auswahl der Paare richtete sich nicht nach deren ASA-Aktivität, sondern nach einer für jeden Probanden mitbestimmten Vergleichsgröße V_r. Der V_r-Wert wurde aus den relativen Aktivitäten dreier Vergleichsenzyme (die wie die ASA lysosomal lokalisiert sind) gemittelt. Probanden - und damit die zugehörigen Paare - mit Werten außerhalb der einfachen Standardabweichung aller V_r-Werte wurden ausgeschieden. Die V_r-Werte zeigten einen Variationskoeffizienten von 19 %, starke Korrelation (r ca. 0,6)

zur ASA-Aktivität, jedoch keine Korrelation zwischen Mutter und Kind (r = 0,09).

Bei den ausgewählten 41 Paaren ergaben sich Andeutungen zweier verschiedener Aktivitätsklassen in der ASA-Verteilung und Anzeichen für zwei distinkte Klassen (eine Klasse in der Nähe von 0) der Mutter-Kind-Differenzen der ASA-Aktivität. Aus diesen vorläufigen Hinweisen wurde der vorsichtige Schluß auf drei Aktivitätsphänotypen gezogen, die ihren Grund in den Genotypen ASA^1/ASA^1, ASA^1/ASA^2 und ASA^2/ASA^2, also den Allelen ASA^1 und ASA^2 haben könnten, wenn die letzteren einfache und doppelte Enzymaktivität hervorrufen würden. Der Versuch, die Aktivitätswerte der Mutter-Kind-Paare den mit diesen Genotypen möglichen Mutter-Kind-Kombinationen zuzuordnen, verlief nicht sehr befriedigend. Immerhin konnten nach dem Zuordnungsversuch die Allel-Frequenzen probeweise ermittelt werden, und zwar für ASA^1 zu 0,357 und für ASA^2 zu 0,643. Die mit diesen Frequenzen errechneten Erwartungshäufigkeiten der verschiedenen Mutter-Kind-Kombinationen stimmen recht gut mit der nach dem Zuordnungsversuch gefundenen Verteilung überein.

Insgesamt erscheint die Evidenz für zwei normale ASA-Allele noch recht gering. Daß diese in Gestalt eines Aktivitätspolymorphismus sich abzuzeichnen beginnen, gibt zu folgenden Überlegungen Anlaß:

Den heterozygoten Überträgern der metachromatischen Leukodystrophie (MLD), einer auf dem Defekt der ASA-Aktivität (Genotyp ASA^o/ASA^o) beruhenden, unheilbaren neurodegenerativen Erkrankung, müßten zwei Genotypen, ASA^o/ASA^1 und ASA^o/ASA^2 zuzuordnen sein. Dadurch würde die enzymatische Identifikation dieser Überträger er-

schwert, denn der Genotyp ASA^{o}/ASA^{2} wäre mittels der hervorgerufenen Aktivität nicht von ASA^{1}/ASA^{1} zu unterscheiden und mit geringerem Aktivitätsspielraum, als sonst bei Heterozygotentests angenommen, von ASA^{1}/ASA^{2} abzugrenzen. Die Schwierigkeit des Heterozygotentests speziell bei der MLD ist tatsächlich bekannt. Bei der genetischen Beratung von MLD-Familien wird aber dieser Test zunehmend wichtiger.

Der Nachweis einer multiplen Allelie der ASA sollte also endgültig erbracht werden. Die Bestimmungsmethode der ASA-Aktivität ist daher unbedingt verbesserungswürdig, wofür einige Ansatzpunkte gezeigt wurden. Auch qualitative Kriterien zur Unterscheidung der Produkte verschiedener ASA-Allele sollten herangezogen werden; die Enzymproteine könnten z. B. verschiedene elektrophoretische Beweglichkeiten oder kinetische Eigenschaften besitzen.

V. Danksagungen

Den Herren Dr. Bissbort, Dr. Kömpf und Prof. Ritter vom Institut für Humangenetik der Universität Tübingen sei für die Vermittlung der Blutproben von Mutter-Kind-Paaren besonderer Dank gesagt.
Herrn Prof. Dietz vom Institut für Med. Biometrie der Universität Tübingen gilt mein Dank für die Beratung und die Berechnung der Korrelationskoeffizienten.
Herrn Prof. Ritter möchte ich, auch im Namen meines Doktorvaters, Herrn Prof. Harzer, für den Hinweis auf die Untersuchung von Mutter-Kind-Paaren sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit danken.
Den zahlreichen freiwilligen Blutspendern aus meiner näheren oder ferneren Bekanntschaft sei an dieser Stelle noch einmal Dank gesagt.
Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Harzer, der mir das Thema überlassen und mir im Laufe der Entstehung dieser Arbeit stets hilfreich zur Seite gestanden hatte, ebenso den übrigen Mitgliedern des Hirnforschungs-Instituts der Universität Tübingen (Direktor Prof. Peiffer), an dem ich die Arbeit ausführen konnte; insbesondere Frau Schuster, die mir in praktischen Dingen viele wichtige Tips gab.

VI. Literaturverzeichnis

Baum, H., Dogdson, K., Spencer, R.: The assay of arylsulfatase A and B in human urine. Clin. chim. Acta 4, 453-455 (1959)

Beratis, N.G., Danesino, C., Hirschhorn, K.: Detection of homozygotes and heterozygotes for metachromatic leukodystrophy in lymphoid cell lines and peripheral leukocytes. Ann. Hum. Gent. 38, 485-493 (1975)

Dulaney, J. T., Moser, H. W. : Sulfatide lipidosis: metachromatic leukodystrophy. In: The metabolic basis of inherited disease, 4th edit. New York: Mc Graw-Hill Blakiston Div., pp.770-809, 1978

Eibl, K.-H.: Serienbestimmung der Arylsulfatase A bei 214 Blutspendern mit der Frage der Erfassung heterozygoter Überträger der metachromatischen Leukodystrophie. Dissertation 1977, Universität Tübingen

Kihara, H., Porter, M.T., Fluharty, A.L., Scott, M.L., De la Flor, S.D., Trammell, J.L., Nakamura, R.N.: Metachromatic leukodystrophy: ambiguity of heterozygote identification. Amer. J. Ment. Defic. 77, 389-394 (1973)

Kömpf, J., Bissbort, S., Ritter, H., Wendt, G.G.: The polymorphism of alanine aminotransferase (EC: 2.5.1.2.): Densitometrical assay. Humangenetik 22, 247-249 (1974)

Lenz, W., Lenz, F.: Grundlinien der Humangenetik. Zu Definition, Terminologie und Methoden. in: Humangenetik, Hrsg. P.E. Becker. Thieme-Verlag Stuttgart, Band I/1, pp.1 - 76, 1968

Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden Springer-Verlag Berlin usw., p. 314, 1968

Tabelle 1

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität (AE)[x]	V_r-Wert[x]	ASA-Aktivität (AE)[x]	V_r-Wert[x]
1	37	53	35	51
2	50	63	21	53
3	62	50	47	49
4	62	57	56	59
5	55	51	54	57
6	75	51	51	43
7	75	51	30	37
8	40	48	43	42
9	66	59	72	57
10	48	55	50	68
11	57	52	41	35
12	51	59	80	57
13	44	49	41	44
14	35	41	35	36
15	58	49	55	49
16	59	49	59	52
17	80	51	59	57
18	42	42	50	50
19	32	48	36	61
20	74	59	36	54
21	63	55	46	47
22	40	74	30	48
23	55	56	57	58
24	24	56	49	56
25	67	55	59	55
26	71	54	53	50
27	51	46	48	55
28	82	69	47	35

[x] s. Methodik

Fortsetzung Tabelle 1

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität (AE)	V_r-Wert	ASA-Aktivität (AE)	V_r-Wert
29	87	64	67	71
30	70	61	66	73
31	41	49	53	54
32	39	39	61	62
33	52	47	82	69
34	45	51	62	57
35	49	49	40	45
36	64	56	47	46
37	40	45	52	57
38	64	58	87	79
39	48	56	43	50
40	58	55	72	58
41	29	44	43	63
42	36	36	59	48
43	44	51	52	49
44	68	63	53	41
45	88	57	62	44
46	44	40	40	44
47	83	55	12	16
48	61	48	49	44
49	23	20	64	51
50	54	53	31	36
51	69	42	31	48
52	26	48	31	48
53	20	36	19	38
54	62	48	62	55
55	40	42	40	54
56	45	40	59	44
57	40	43	44	44

Fortsetzung Tabelle 1

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität (AE)	V_r-Wert	ASA-Aktivität (AE)	V_r-Wert
58	46	56	61	52
59	20	38	29	53
60	43	52	36	42
61	49	54	37	55
62	50	47	58	57
63	65	54	42	44
64	69	58	52	43
Mittelwert:	52,9	50,9	49,0	50,8
Standardabweichung:	16,6	8,5	14,8	10,2

Tabelle 2

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 o. 30 AE, Allele ASA^1 u. ASA^2	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 o. 30 AE, Allele ASA^1 u. ASA^2
1	35/39	15 + 15	33/36	15 + 15
3	58/67	30 + 30	46/48	15 + 30
4	61/63	30 + 30	51/61	30 + 30
5	52/57	30 + 30	50/57	30 + 30
6	66/84	30 + 30	50/51	15 + 30
8	38/42	15 + 30	42/44	15 + 30
9	66/66	30 + 30	67/76	30 + 30
12	50/52	15 + 30	74/86	? + ?
13	43/45	15 + 30	41/41	15 + 30
15	56/59	30 + 30	54/56	30 + 30
16	57/61	30 + 30	55/62	30 + 30
17	76/83	? + ?	57/60	30 + 30
18	41/43	15 + 30	50/50	15 + 30
20	72/75	? + ?	35/37	15 + 15
21	62/64	30 + 30	45/47	15 + 30
23	55/55	30 + 30	56/58	30 + 30
24	24/24	15 + 15	48/50	15 + 30
25	65/68	30 + 30	59/59	30 + 30
26	62/79	30 + 30	50/55	15 + 30
27	50/52	15 + 30	47/49	15 + 30
31	38/44	15 + 30	51/54	15 + 30
34	44/46	15 + 30	59/64	30 + 30
35	45/53	15 + 30	38/41	15 + 30
36	62/65	30 + 30	41/52	15 + 30
37	37/42	15 + 30	50/53	15 + 30
39	47/49	15 + 30	40/46	15 + 30
40	55/61	30 + 30	69/75	? + ?

Fortsetzung Tabelle 2

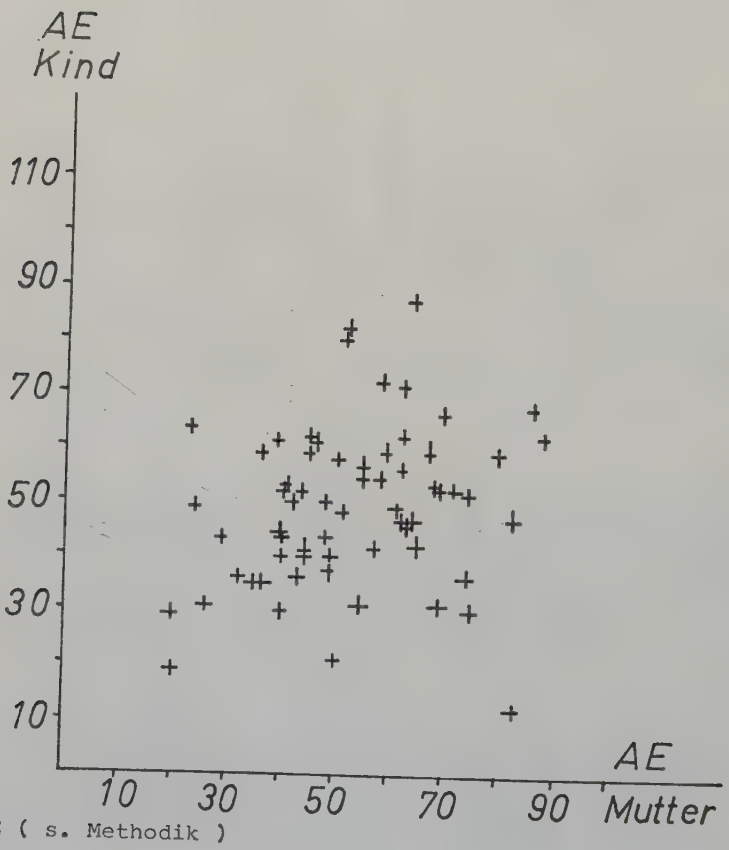
Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 o. 30 AE, Allele ASA^1 u. ASA^2	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 o. 30 AE, Allele ASA^1 u. ASA^2
43	42/45	15 + 30	50/53	15 + 30
45	85/90	? + ?	62/62	30 + 30
48	60/62	30 + 30	47/50	15 + 30
51	67/70	30 + 30	30/32	30 + 0 ??[x]
52	23/28	15 + 15	29/33	15 + 15
54	61/63	30 + 30	62/62	30 + 30
55	38/42	15 + 30	39/41	15 + 30
57	40/40	15 + 30	43/45	15 + 30
58	44/47	15 + 30	58/64	30 + 30
60	42/44	15 + 30	33/38	15 + 15
61	46/52	15 + 30	31/42	15 + 15
62	49/51	15 + 30	58/58	30 + 30
63	48/52	15 + 30	40/43	15 + 30
64	62/75	30 + 30	48/56	15 + 30

[x] Paar 51 kann formal z. B. so gedeutet werden, daß das Kind heterozygot für MLD ist, also ein Allel ASA^0 besitzt.

Paare, in denen ? + ? vermerkt sind, wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt (s. Text).

Abbildung 1:

ASA-Aktivität (AE) bei 64 Mutter-Kind-Paaren
(vgl. Tabelle 1)



AE (s. Methodik)

Abbildung 2:

ASA-Aktivitäten (beide Werte der Doppelbestimmung)
bei 41 Mutter-Kind-Paaren (s. Text)

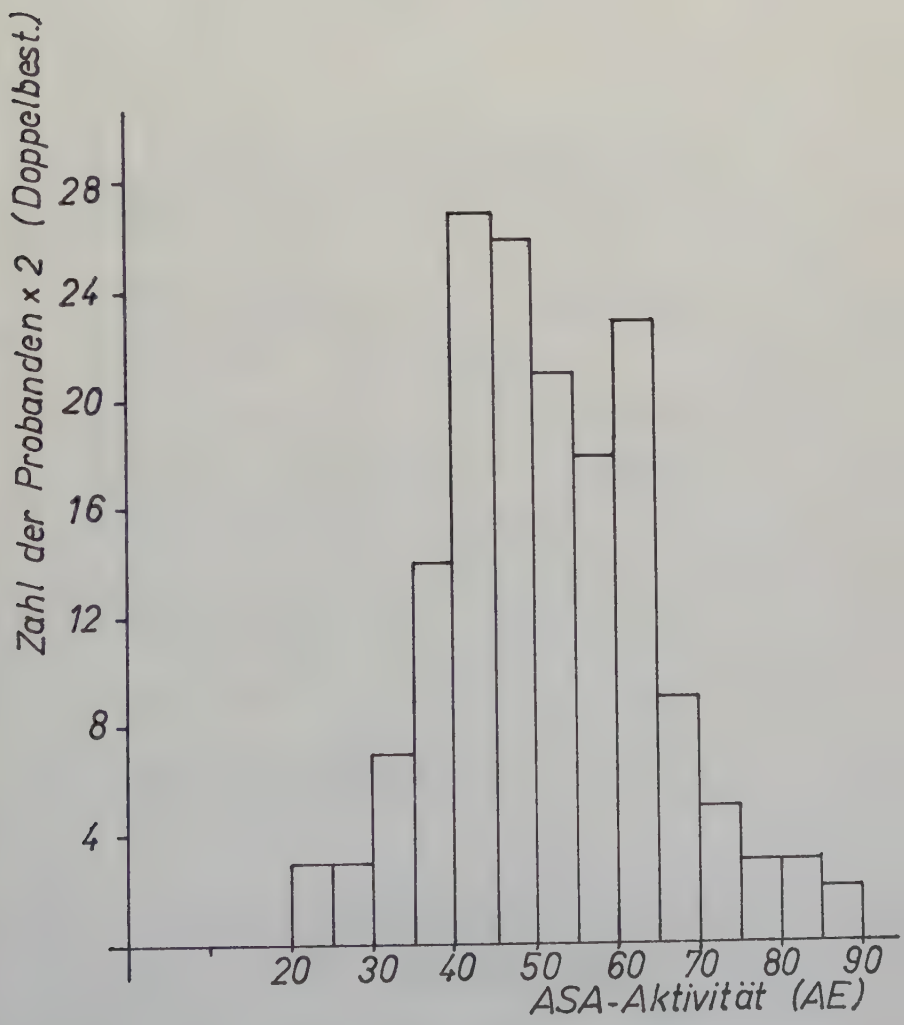
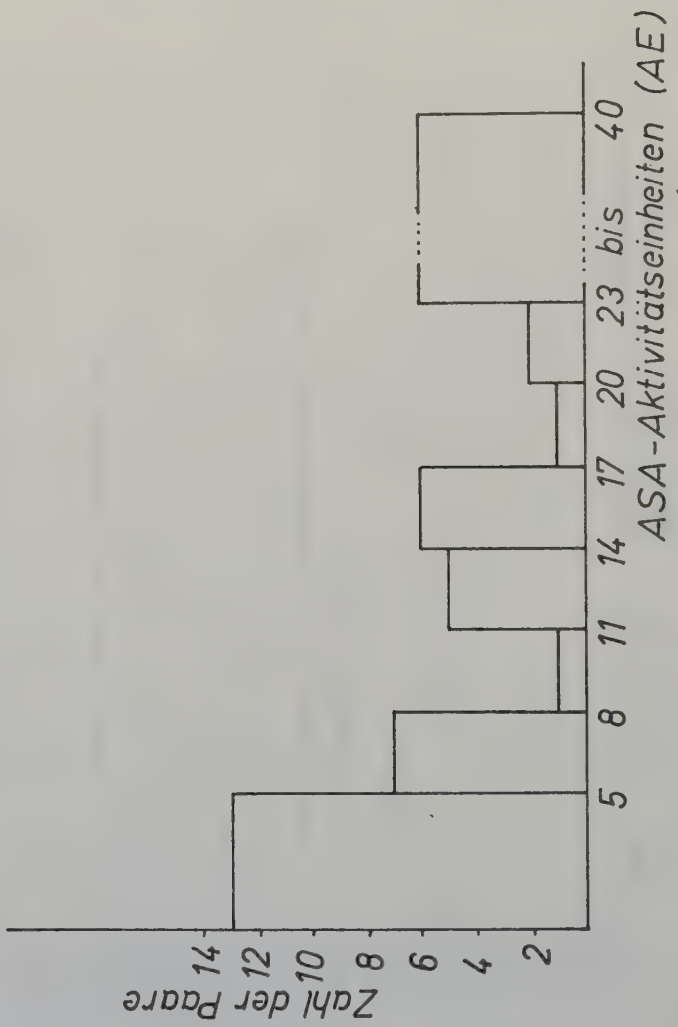


Abbildung 3:

Intrapaar-Differenzen der ASA-Aktivitäten von 41 Mutter-Kind-Paaren (s. Text)



LEBENSLAUF

Am 11. Dezember 1951 wurde ich, Karl Immanuel Gußmann, als Sohn des Schreiners Georg Gußmann und seiner Ehefrau Liselotte geb. Eipper in Kayh, jetzt Herrenberg-Kayh, Kreis Böblingen geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Grundschule in Kayh, von 1962 bis 1970 das Schickhardt-Gymnasium in Herrenberg, an dem ich im Juni 1970 das Abitur ablegte; anschließend leistete ich meinen Grundwehrdienst ab.

im Sommersemester 1972 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen, wo ich im März 1973 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im September 1974 die ärztliche Vorprüfung ablegte.
Die ärztliche Prüfung bestand ich am 16. Oktober 1978.

Seit dem 17. Oktober 1975 bin ich mit der Lehrerin Petra geb. Kuhn verheiratet.

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321